



PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **06141850 A**(43) Date of publication of application: **24 . 05 . 94**

(51) Int. Cl

C12N 5/02
C12M 3/02
C12N 5/06

(21) Application number: **04296825**(22) Date of filing: **06 . 11 . 92**(71) Applicant: **HITACHI LTD**

(72) Inventor: **MURAKAMI HIKARI**
HAGA RYOICHI
MATSUZAKI HARUMI
MURAKAMI SEI

(54) **CULTURE SYSTEM FOR ANIMAL CELL AND
 METHOD FOR CULTURE OF ANIMAL CELL**

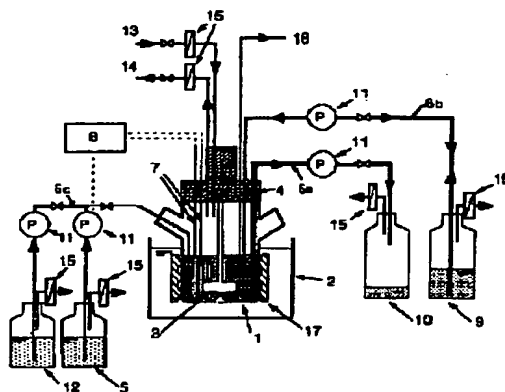
favorable perfusion culture of cells with nature liable to form cell aggregates.

(57) Abstract:

COPYRIGHT: (C)1994,JPO&Japio

PURPOSE: To provide the subject system and method capable of continuously performing suspension perfusion culture in a favorable state even for adherable or spendable cells with nature liable to form cell aggregation while selectively eliminating such cell aggregates formed.

CONSTITUTION: A culture tank body 1 equipped with an agitating means 37 is sterilely connected, via respective pumps 11,11, to a temporary cell reservoir 9 and a waste liquor tank 10. During culture, agitation is temporarily stopped to sediment cell aggregates developed, and a supernatant culture fluid containing proper cells to be recovered is put to suction into the reservoir 9 where the culture fluid is temporarily reserved and cell aggregates stuck to the tank wall are debonded by such means as vigorous agitation or application of vibratory ultrasonic waves and discharged, together with cell aggregates left in the culture tank, into the waste liquor tank 10. Then, the proper cells are returned to the culture tank and culture operation is continued while eliminating cell aggregates, resulting in selection of necessary amount of such fine proper cells which are left in the culture tank, thus enabling material production by continuous



(19)日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-141850

(43)公開日 平成6年(1994)5月24日

(51)Int.Cl.⁵

C 1 2 N 5/02

C 1 2 M 3/02

C 1 2 N 5/06

識別記号

庁内整理番号

9281-4B

F I

技術表示箇所

9281-4B

C 1 2 N 5/ 00

E

審査請求 未請求 請求項の数13(全 9 頁)

(21)出願番号

特願平4-296825

(22)出願日

平成4年(1992)11月6日

(71)出願人 000005108

株式会社日立製作所

東京都千代田区神田駿河台四丁目6番地

(72)発明者 村上 光

茨城県日立市大みか町七丁目1番1号 株式会社日立製作所日立研究所内

(72)発明者 芳賀 良一

茨城県日立市大みか町七丁目1番1号 株式会社日立製作所日立研究所内

(72)発明者 松崎 晴美

茨城県日立市大みか町七丁目1番1号 株式会社日立製作所日立研究所内

(74)代理人 弁理士 平木 祐輔

最終頁に続く

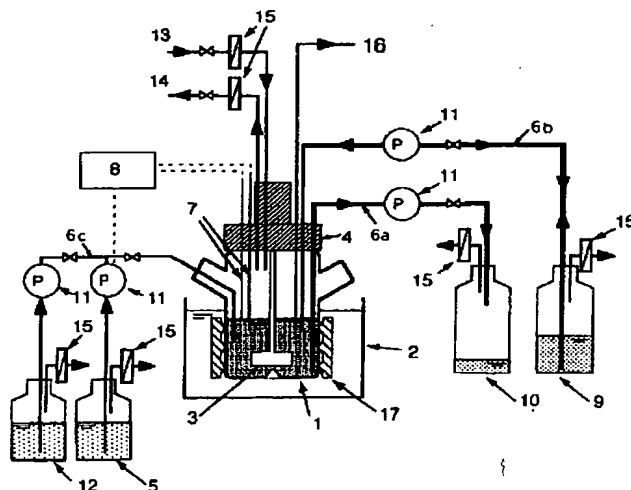
(54)【発明の名称】 動物細胞の培養装置及び培養方法

(57)【要約】

【目的】 付着性を持ち細胞塊を形成しやすい性状を持つ浮遊性細胞でも、形成された細胞塊を選択的に除去しつつ、良好な状態で連続的に懸濁灌流培養を行うことができる培養方法及び培養装置を提供する。

【構成】 培養槽本体1は攪拌手段3があり、細胞一時保留槽9及び廃液槽10がポンプ11を介して無菌的に接続している。培養の途中で攪拌を一時停止し、細胞塊を沈降させた後、回収する適正細胞を含む上澄み培養液を細胞一時保留槽9に吸引して一時保留し、強攪拌、振動超音波を与える等の手段により器壁に付着する細胞塊を剥離し培養槽に残った細胞塊とともに廃液槽10に排出する。その後、前述の細胞を培養槽に戻すことで細胞塊を除去しながらの培養を継続する。

【効果】 細胞塊を形成しやすい性状を持つ細胞でも、細胞塊を培養系外に除去し、こまかい適正な細胞を選択して必要な量だけ、培養槽に残して培養を継続することができるので、細胞塊を形成しやすい性状を持つ細胞の良好な連続灌流培養による物質生産が可能となる。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 動物細胞を培養する際細胞の一部を排出しながら連続的に培養を行う培養方法において、培養の途中で間歇的に、必要量の適正細胞を含む培養液を培養槽と連結した別槽に一時保留する工程、培養槽あるいは培養槽内培養液に振動を生じさせ培養槽内の器壁等に付着した細胞塊を剥離させる工程、剥離した細胞塊を培養槽に残留した培養液と共に培養槽外に排出する工程、及び前記保留した培養液を培養槽に戻し培養を継続する工程、とを有することを特徴とする動物細胞の培養方法。

【請求項2】 動物細胞を培養する際細胞の一部を排出しながら連続的に培養を行う培養方法において、培養の途中で間歇的に、培養液の攪拌を一時停止して培養中の細胞塊のみを沈降させる工程、必要量の適正細胞を含む上澄み培養液を培養槽と連結した別槽に一時保留する工程、培養槽あるいは培養槽内培養液に振動を生じさせ培養槽内の器壁等に付着した細胞塊を剥離させる工程、剥離した細胞塊を培養槽に残留した培養液と共に培養槽外に排出する工程、及び前記保留した培養液を培養槽に戻し培養を継続する工程、とを有することを特徴とする動物細胞の培養方法。

【請求項3】 動物細胞を培養する際細胞の一部を排出しながら連続的に培養を行う培養方法において、培養の途中で間歇的に、培養槽あるいは培養槽内培養液に振動を生じさせ培養槽内の器壁等に付着した細胞塊を剥離させる工程、培養液の攪拌を一時停止して培養中の細胞塊のみを沈降させる工程、必要量の適正細胞を含む上澄み培養液を培養槽と連結した別槽に一時保留する工程、培養槽に残留した細胞塊を含む培養液を排出する工程、及び前記保留した培養液を培養槽に戻し培養を継続する工程、とを有することを特徴とする動物細胞の培養方法。

【請求項4】 前記必要量の適正細胞を含む上澄み培養液を培養槽と連結した別槽に一時保留する工程と、前記別槽に一時保留した細胞を培養槽に戻す工程との間に、培養槽の無菌状態を保ったままで培地あるいは生体の細胞に適した浸透圧及びpHに調整した緩衝液を培養槽内に導入する工程をさらに有することを特徴とする、請求項1ないし3いずれか記載の動物細胞の培養方法。

【請求項5】 前記緩衝液がリン酸緩衝液である、請求項4記載の動物細胞の培養方法。

【請求項6】 培養槽あるいは培養槽内培養液に生じさせる振動は、培養液自体の強度の機械的あるいは通気による攪拌、培養液への超音波の付与、あるいは培養槽に付設された振動発生装置により生じる振動のいずれか又はその組合せであることを特徴とする、請求項1ないし4記載の動物細胞の培養方法。

【請求項7】 培養中、培養液のグルコース濃度を測定しグルコース濃度より産出されるグルコース消費速度が細胞濃度に対して所定の比例関係より外れたことを検知して、付着細胞塊の剥離及び細胞塊の除去操作を行うこ

とを特徴とする、請求項1ないし4記載の動物細胞の培養方法。

【請求項8】 動物細胞が、浮遊性の細胞である請求項1ないし7記載の動物細胞の培養方法。

【請求項9】 少なくとも下記要素1)～3)、

1) 培養液の一部を取り出す手段と残りの培養液を排出する手段とを有する培養槽、

2) 前記培養槽及び／又は培養槽内の培養液に振動を生じさせる手段、及び

3) 前記培養液の一部を取り出す手段と取り出された培養液を培養槽に戻す手段とに無菌的に接続した細胞一時保留槽、とからなることを特徴とする動物細胞培養装置。

【請求項10】 前記培養槽及び／又は培養槽内の培養液に振動を生じさせる手段が、培養槽内に設けた培養液の機械的攪拌手段、培養液への通気手段、培養槽に付設した振動発生手段、及び超音波発生手段のいずれか、又はその組合せであることを特徴とする、請求項9記載の動物細胞培養装置。

【請求項11】 前記培養液の一部を取り出す手段と取り出された培養液を培養槽に戻す手段は、前記培養槽又は細胞一時保留槽のいずれかを陰圧あるいは加圧する手段であることを特徴とする、請求項8記載の動物細胞培養装置。

【請求項12】 請求項1ないし8記載の動物細胞の培養方法を用いて動物細胞を培養し有用物質を生産させる工程、前記工程より回収した有用物質を含む培養液を分離し精製する工程、及び精製した有用物質を製剤化する工程、とからなる医薬品製造システム。

【請求項13】 請求項9ないし11記載の動物細胞培養装置を用いて動物細胞を培養し有用物質を生産させる手段、前記手段より回収した有用物質を含む培養液を分離し精製する手段、及び精製した有用物質を製剤化する手段、とからなる医薬品製造装置。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は動物細胞の培養方法及び装置に係り、特に、細胞を長期間連続的に良好な状態で培養する方法及び装置に関する。

【0002】

【従来の技術】動物細胞の培養は、ワクチン、インターフェロン、モノクローナル抗体等の有用物質の製造にとって重要な技術であり、これらの有用物質は、ハイブリドーマや遺伝子組替CHO（チャイニーズハムスター卵巣）細胞等の動物細胞を大量培養することにより生産される。

【0003】有用物質の生産効率を高めるためには、高い細胞密度を維持しつつ動物細胞を培養する技術が必須である。それには、細胞を培養する際、酸素を十分供給し、かつ細胞に必要な栄養物質を十分に供給すると同時

に培養液中に蓄積してくる代謝老廃物質を速やかに除去して培地環境を良好にすることが要求され、そのための具体的な手法として、連続的に培養液を細胞と分離して培養系外に排出し、新鮮培地を培養槽に供給しながら連続培養する、いわゆる灌流培養法が有効であると知られている。特に浮遊性細胞の培養での培養液の交換手段としては、培養槽内に設けられた細胞沈殿管、培養槽内若しくは培養槽に付設される培養液循環路に設けられた濾過手段によるものが知られている。

【0004】一般にハイブリドーマ等の細胞では、細胞の増殖が定常状態での長期培養において細胞当りの物質生産性が向上すると知られており、高密度での定常状態を安定に保つ培養方法がとられるが、細胞株の種類によっては、細胞が増殖期にある方が生産性が高い場合もあり、公開特許公報平3-172172号に述べられているように、細胞を含む培養液を一部抜き出しながら、細胞を増殖状態に保って生産に良好な条件での連続培養を行なう方法も知られている。

【0005】一方で、動物細胞はハイブリドーマのような浮遊性細胞とCHO細胞等の付着性細胞に大別されるが、浮遊性であっても株によっては付着性を持ち、細胞同志あるいは器壁に対して付着し、細胞塊を形成しやすい性状を持つものも多い。例えば、本来付着性であるような宿主細胞に対し、遺伝子組替を行って有用物質を生産させる場合も、浮遊培養の方がスケールアップ性等工業的物質生産において有効と考えられ、浮遊培養へ適用することが多い。しかし、その場合上記のように培養中その付着性によって培養槽内の器壁等へ付着する等して細胞塊を形成しやすい。細胞塊は浮遊中に形成されるもの、器壁等に付着して形成されるものがあり、生きた細胞あるいは死んだ細胞により形成されているが、細胞塊の周りの細胞をかき集めさらに大きな細胞塊へと成長し、培養液中のばらばらで浮遊状態にある適性細胞の濃度は減少する。細胞塊が生きた細胞である場合、物質生産性が低下したり、酸素や栄養が行き届かず中の細胞から死滅してしまう。また、培養液交換手段においても濾過手段の目詰まりを起こす等、その妨げとなるという問題がある。

【0006】従来の培養技術ではそういった細胞に対して、より良好な状態での連続培養を行うため、培養中形成された細胞塊を除去する手段を設けた培養装置も開発されている。例えば、公開特許公報平1-206988号には培養槽に付設される培養液循環路に設けられた濾過手段により、培養液中に浮遊する細胞塊を除去し適性細胞は培養槽へ戻すことで培養を継続するものが開示されている。この装置によれば浮遊する細胞塊は有効に除去することはできるが、培養槽内の器壁等へ付着して形成された細胞塊に対しての配慮はなされておらず、付着して存在する細胞塊の除去は依然として課題として残されている。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】上記のように、付着性を持ち細胞塊を形成しやすい性状を持つ細胞によって、従来の浮遊培養で連続培養を行なう場合、濾過手段によって培養液中の細胞塊はある程度除去しつつ培養を行うことができるが、培養槽の器壁等に付着した細胞塊はそのまま成長を続けることから、前記のように連続培養に対する支障は完全には解決していない。

【0008】本発明の目的は、細胞塊を形成しやすい性状を持つ細胞であっても、適正な細胞を保持した状態で、細胞塊特に培養槽内の器壁等へ付着する等して形成した細胞塊をも選択的に除去しつつ、良好な状態で連続的に培養することができる培養方法と培養装置を提供することにある。

【0009】

【課題を解決するための手段】上記目的を達成するために、本発明による動物細胞を培養する方法は、基本的に培養の際細胞の一部を排出しながら連続的に培養を行う培養方法であり、その培養の途中で間歇的に、必要量の適正細胞を含む培養液を培養槽と連結した別槽に一時保留する工程と、培養槽あるいは培養槽内培養液に振動を生じさせ培養槽内の器壁等に付着した細胞塊を剥離させる工程と、剥離した細胞塊を培養槽に残留した培養液と共に培養槽外に排出する工程と、及び前記保留した培養液を培養槽に戻し培養を継続する工程、とを有する。

【0010】また、本発明による動物細胞培養装置は基本的に、少なくとも、1) 培養液の一部を取り出す手段と残りの培養液を排出する手段とを有する培養槽、2) 前記培養槽及び／又は培養槽内の培養液に振動を生じさせる手段、及び3) 前記培養液の一部を取り出す手段と取り出された培養液を培養槽に戻す手段とに無菌的に接続した細胞一時保留槽、とを有している。

【0011】本発明によれば、浮遊してあるいは器壁等に付着して成長した大きな細胞塊を培養系外に除去し、適正細胞すなわち細胞塊を形成しておらずばらばらで浮遊状態にある細胞及び細胞塊のうち極小なものを必要な量だけ、培養槽に残して培養することにより培養が継続される。そのためには、適正細胞を含む培養液を必要な量だけ、一時的に培養槽から無菌的に接続された別の槽に移し、その後培養槽に残留した細胞塊を培養液と共に更に別に設けた槽に排出し、先の一時的に保留している適正細胞を含む培養液を培養槽に戻し、培養を継続するものである。

【0012】また、培養槽に残留した細胞塊を完全に排出するために、培地あるいは生体の細胞に適した浸透圧及びpHに調整した緩衝液等を注入して槽内を洗浄した後保留している培養液を培養槽に戻し、培養を継続することは好ましい態様である。また、器壁等に付着して成長してしまった大きな細胞塊を除去するために、まず培養槽自体あるいは培養液に振動を与えるか、又は強度

の機械攪拌、あるいは強攪拌と停止とを数回繰返すことにより器壁等より細胞塊を剥離させ、付着した細胞塊を剥離させた状態で除去するようにしてもよい。若しくは必要な細胞を回収後、洗浄用の培地あるいは緩衝液を培養槽に満し、培養槽に振動又は超音波を与えるか、又は強度の機械攪拌、あるいは強攪拌と停止とを数回繰返すことにより、細胞塊を破壊し完全に剥離させ、除去するようにしてもよい。

【0013】また、細胞塊を形成していないばらばらの適正細胞と、成長した巨大な細胞塊とを分離するためには、培養槽の攪拌を一時停止して、巨大に成長した細胞塊のみを沈降させる時間、細胞及び細胞塊を含む培養液を静置し、それにより適正細胞を含む上澄み培養液を、沈降した巨大細胞塊を抜き出してしまわない高さに開口部を設定した配管より抜き出し、別槽に一時保留するようにしてもよい。

【0014】また、適正細胞を含む培養液を必要な量だけ保留槽に移すためには、培養槽の底面から、特定量の培養液を抜き出すに十分な高さであり、かつ沈降させた巨大細胞塊を抜き出してしまわない高さだけ離れた位置に開口部を持つ配管を設けることにより、特定量抜き出すようにすることが好ましい。更に、培養系外に排出する残留した培養液及び巨大細胞塊及び洗浄液をほぼ完全に抜き出すためには、培養槽の底面から、残留した培養液をほぼ完全に抜き出すに十分であり、かつ巨大細胞塊を抜き出すに十分な高さだけ離れた位置に開口部を持つ配管より、残留した培養液及び細胞塊を抜き出すようにすることが好ましい。

【0015】さらに、培養系外に排出する、残留した培養液及び巨大細胞塊及び洗浄液をほぼ完全に抜き出すためには、培養槽の底面から、残留した培養液をほぼ完全に抜き出すに十分であり、かつ巨大細胞塊を抜き出すに十分な高さだけ離れた位置に開口部を持つ配管より、残留した培養液及び細胞塊を抜き出すようにすることが好ましい。

【0016】また、細胞又は細胞塊を含む培養液を、培養槽から保留槽又は廃棄細胞の貯留槽へと無菌的に移動させるためには、一時保留槽又は廃棄細胞の貯留槽を培養槽とチューブで連結し、一時保留槽あるいは廃棄槽側を陰圧にあるいは加圧することにより、細胞を培養槽から一時保留槽へあるいは一時保留槽から培養槽へと移動させることもできる。あるいは、連結するチューブの間にポンプを組み込み、ポンプにより細胞を培養槽から一時保留槽へあるいは一時保留槽から培養槽へと移動するようにしてもよい。

【0017】

【作用】本発明においては、培養中、浮遊してあるいは器壁等に付着して成長した大きな細胞塊が培養系外に除去されることで、周囲の細胞を付けながら成長する細胞塊がそれ以上大きな細胞塊に成長することが防がれ、細

胞塊の成長による培養液中の浮遊細胞濃度の減少が抑えられる。さらに細胞塊の形成によって起こっていた物質生産性の低下が改善される。

【0018】培養槽から無菌的に接続された別の槽は、細胞塊を形成していないばらばらの細胞や細胞塊のうち極小さなものを必要な量だけ、培養槽から移して一時的に保留し、更に別に設けた培養槽から無菌的に接続された槽は、培養槽に残留した不要な細胞及び巨大な細胞塊を廃棄し貯留する。器壁等に付着して成長してしまった大きな細胞塊に対して、培養槽自体に振動を与えるか、又は強度の機械攪拌、あるいは強攪拌と停止とを数回繰返すことにより、付着した大きな細胞塊は器壁等より剥離する。更には必要な細胞を回収後、洗浄用の培地あるいは生体の細胞に適した浸透圧及びpHに調整した緩衝液を培養槽に満し、培養槽に振動及び超音波を与えるか、又は強度の機械攪拌、あるいは強攪拌と停止とを数回繰返すことにより、細胞塊は破壊され完全に剥離させる。特に生体の細胞に適した浸透圧及びpHに調整したリン酸緩衝液(PBS)を満すことにより細胞塊はより剥がれやすくなる。以上により効果的に細胞塊を除去することができる。

【0019】また、培養槽の攪拌を一時停止して細胞及び細胞塊を含む培養液を静置すると、巨大に成長した細胞塊は、浮遊状態のばらばらの細胞及び極小さな細胞塊に比べ、沈降速度が早いので、細胞塊のみが沈降した段階で、細胞及び極小さな細胞塊が浮遊状態の上澄み液を別槽に抜き出すことで、浮遊状態の細胞を選択的に回収することができる。

【0020】また、培養液のグルコース濃度より算出されるグルコース消費速度が細胞濃度に対して所定の比例関係にある場合には、培養液中に浮遊して計数される細胞数が正確であり、細胞の付着及び細胞塊の形成が進んでいないが、これより外れた場合、細胞の付着及び細胞塊の形成が進んでいるため、付着細胞の剥離及び細胞塊の除去作業が必要となる。すなわち、グルコース消費速度と細胞濃度との関係を検知することで、より効果的なタイミングで付着細胞の剥離及び細胞塊の除去操作を行うことができる。

【0021】以上のように、細胞塊を形成しやすい性状を持つ浮遊性細胞でも、形成された細胞塊が除去され、選択的に浮遊化した細胞を残し培養及び生産に良好な状態で培養を継続することができる。

【0022】

【実施例】

〔実施例1〕図1は、本発明による灌流培養装置の実施例1を概略的に示した説明図であり、小スケールのスピナフラスコである培養槽1は恒温槽2中に設置される。培養槽1はこれを密閉し得る着脱可能な蓋体4を有し、該蓋体4には攪拌子3、2本の液面レベルセンサ7、7、通気管13、排気管14、サンプリング管1

6、及び後述する廃液用管路6 a及び回収細胞用管路6 bとが、それぞれ所定の位置に設定されている。通気管1 3及び排気管1 4には除菌フィルタ1 5、1 5が設けられ、また、液面レベルセンサ7、7は最高位液面レベル及び最低位液面レベルを制御するものでありレベルコントローラ8に接続している。

【0023】廃液用管路6 aは、培養槽1内においてその底部近傍まですなわち培養槽1の底面から残留した培養液をほぼ完全に抜き出すに十分でありかつ巨大細胞塊を抜き出すに十分な高さだけ離れた位置にその一方端を延出し、他方端は培養槽1とは別個に配置された廃液槽1 0に開口している。回収細胞用管路6 bはその一方端を培養槽1内に培養液が注入されたときの液面より幾分下方位置となる位置まで、すなわち培養槽の底面から特定量の培養液を抜き出すに十分な高さでありかつ沈降させた巨大細胞塊を抜き出してしまいうに至らない高さだけ離れた位置まで延出しており、他方端は培養槽1とは別個に配置された回収細胞のための一時保留槽9に開口している。

【0024】培養槽1外には新鮮培地槽5及び洗浄液槽(緩衝液槽)1 2が位置しており、それぞれポンプ1 1、1 1及び配管6 cを介して培養槽1内に連通している。新鮮培地槽5に接続したポンプ1 1には液面レベルセンサ7、7からの情報がレベルコントローラ8を介して伝達される。また、上記した廃液槽1 0、回収細胞一時保留槽9、新鮮培地槽5、及び洗浄液槽1 2にはそれぞれ除菌フィルタ1 5、1 5を介して大気側に連通している。

【0025】この実施例において、培養槽1は、恒温槽2内に位置する振動発生器1 7により外側から包持されており、振動発生器1 7の作動により培養槽1には振動が与えられる。この灌流培養装置の作動に当たって、新鮮培地槽5からポンプ1 1及び管路6 cを介して新鮮培地を培養槽1内に導入しかつ細胞を導入し、恒温槽2等の培養環境を整えたのち、培養を開始する。その間に必要に応じて攪拌子3により培養液の攪拌を行う。

【0026】培養の経過と共に培養液中に浮遊したあるいは培養槽1の器壁に付着した細胞塊が発生する。後記するように例えば図示しないグルコースセンサからの情報により細胞塊の除去が必要となったと判断された時点において、攪拌子3の作動を一時停止し、細胞塊を培養槽1の底部に沈降させる。その後、回収細胞一時保留槽9をポンプ1 1により陰圧状態にし、適正細胞を含む上澄み培養液を回収細胞用管路6 bを介して吸引して一時保留槽9に一時保留する。

【0027】次に、必要に応じて洗浄槽1 2からの洗浄液(緩衝液)を培養槽1内に滴した後、振動発生装置1 7を作動させて培養槽1に振動を与え、器壁等に付着して成長した大きな細胞塊を機壁から剥離させる。剥離*

*した細胞塊と浮遊状態にある細胞塊とをポンプ1 1を作動させて残りの培養液と共に管路6 aを介して廃液槽1 0に排出し培養槽1を空の状態とする。

【0028】なお、機壁等に付着した細胞塊の付着力が小さいものである場合には、前記振動発生装置1 7を作動させずに、攪拌子3の強攪拌と一時停止の操作を繰り返すことにより付着した細胞塊を剥離するようにしてもよい。また、付着細胞の種類によっては洗浄液を導入しなくても初期の目的を達成することができる場合もあり得る。

【0029】その後、配管6 bに配置したポンプ1 1を作動して、先に保留しておいた上澄み液中の適正細胞を一時保留槽9から培養槽1に戻す。排出した分の培養液の補充は新鮮培地槽5より配管6 cを介して新鮮培地を培養槽1に注入することで行う。液量はレベルセンサ7及びレベルコントローラ8により制御される。なお、通気及び排気は、通気管1 3及び排気管1 4より除菌フィルタ1 5を通して行われる。

【0030】以上の操作を培養の途中で間歇的に行うことによって、細胞塊を形成しやすい性状を持つ浮遊性細胞でも、形成された細胞塊が除去され、選択的に浮遊化した細胞を残し培養及び生産に良好な状態で培養を継続することが可能となる。なお、既に記したように、付着した細胞塊を器壁より剥離するための洗浄液には、培地あるいは生体の細胞に適した浸透圧及びpHに調整した緩衝液を用いることが好ましく、特に迅速さが要求される培養中の洗浄操作においてはリン酸緩衝液(PBS)が好ましい。

【0031】表1は浮遊化CHO細胞を用いて行った培地及びPBSによる付着細胞の剥離実験の結果を示している。本細胞は付着性であるCHO細胞を無血清でスクリーニングし浮遊化させたものであるが、器壁に対して、また細胞同志で非常に付着しやすい。実験でφ35ディッシュを用い、37.5時間培養後培養液を除去し、ディッシュ底面に付着した細胞に対し洗浄液(①培地、②PBS)を注入し、一定時間(10分、40分)、(a)振盪(振幅2cm、100ストローク/min)、あるいは(b)静置して、洗浄液中に剥離した細胞とディッシュ底面に残った細胞数を計測した。表中、カッコ内に全付着細胞数に対する割合を示した。

【0032】その結果、特に短期間振盪を行う場合には、培地では36%剥離したのに対してPBSでは67%が剥離し、PBSの方がより効果的であるが、長時間経過すると培地、PBSで効果はほぼ同程度となった。従って、迅速さが要求される培養中の洗浄操作においては、PBSを用いることが好ましいことがわかる。

【0033】

【表1】

付着細胞の剥離実験結果

	①-a		②-a		①-b		②-b	
洗 淨 液	培地		PBS		培地		PBS	
操 作	振 盪				靜 置			
接種細胞数	1.70				1.15			
培養後総細胞数	3.55	3.61	2.73	2.89	2.59	1.29	1.43	2.42
浮遊細胞数	0.66	0.82	0.76	1.28	0.59	0.19	0.34	0.26
付着細胞数	2.89	2.79	1.97	1.61	2.00	1.10	1.08	2.16
10分振盪or靜置後 剥離細胞数	1.05 (36%)	—	1.32 (67%)	—	0.22 (11%)	—	0.09 (8%)	—
40分振盪or靜置後 剥離細胞数	—	2.59 (93%)	—	1.39 (87%)	—	0.95 (86%)	—	1.56 (72%)

(単位:10⁴ cells)

培養条件: CHO細胞、2ml(φ35ディッシュ)、37.5時間培養

振盪条件: 振幅2cm、100ストローク/min

【0034】〔実施例2〕図2は本発明による培養装置の実施例2を概略的に示した説明図であり、培養槽1に振動を与える手段として培養槽1を従来知られた振盪機18に固定したものである。他の構成は図1の実施例のものと同様であり、この実施例においても必要に応じて洗浄用の培地等を満たした後、適正細胞を一時保留槽9に一時保留した後、前記振盪機18を作用させて細胞塊を剥離する。

〔実施例3〕図3は本発明による培養装置の実施例3を概略的に示した説明図であり、サンプリング管16の途中にさらにグルコースセンサ19を取り付け、培養液のグルコース濃度をグルコースアナライザ20により分析できるようにしたものである。前記のように、培養液のグルコース濃度より算出されるグルコース消費速度が細胞濃度に対して所定の比例関係にある場合には、培養液中に浮遊して計数される細胞数は正確であり、細胞の付着及び細胞塊の形成が進んでいないが、これより外れた場合、細胞の付着及び細胞塊の形成が進んでいることとなるため、この実施例のものにおいてはグルコース消費速度と細胞濃度との関係を検知することで、より効果的なタイミングで付着細胞の剥離及び細胞塊の除去操作を行うことが可能となる。

〔実施例4〕図4は本発明による培養装置の実施例4を概略的に示した説明図である。全体としてはエアリフト型の灌流培養装置であり、培養槽41に超音波を与える手段を具備したことを特徴とする。図において、41はエアリフト型培養槽であり、上槽41a、上槽41aに細管部を介して連通する下槽41b、及び上槽41aと下槽41bを連通するバイパス管路41cとから構成される。上槽41aは恒温槽ジャケット42を具備しており、さらに、上槽41aにはこれを密閉しうる着脱可能な蓋体44が設けられ、該蓋体44には2本の液面レベルセンサ7、7、排気管14、及び温度センサ24とがそれぞれ所定の位置に設定されている。排気管14には

除菌フィルタ15が設けられ、また、液面レベルセンサ7、7はレベルコントローラ8に接続している。

【0035】さらに、上槽41aの側壁部から上槽41a内部に向けてDO・pHセンサ23、及びサンプリング管16が延出しており、サンプリング管の途中に設けられたグルコースセンサ19はグルコールアナライザ20に、DO・pHセンサ23は後述するコントローラ25に接続している。下槽41bには細胞分離フィルタ28が配置されていると共に、最下方には通気ノズル18が設けられ該通気ノズル18は図示しない適宜の送気源に接続している。通気ノズル18に近接してその上方には廃液用管路6aの一端が開口しておりその他方端は廃液槽10に開口している。さらに、下槽41bの上方部には回収細胞用管路6bの一方端が特定量の培養液を抜き出すに十分な高さでありかつ沈降させた巨大細胞塊を抜き出してしまわない位置まで延出して設けられており、他方端は回収細胞のための一時保留槽9に開口している。各管路にはポンプ11が配置されている。

【0036】また、下槽41bの下方部には管路6cの一端が開口しており、その他端は培養槽41外に設けられた新鮮培地槽5、培養ろ液槽6、及び洗浄液槽(緩衝液槽)12にそれぞれポンプ11、11を介して連通している。新鮮培地槽5及び培養ろ液槽6に接続したポンプ11には液面レベルセンサ7、7からの情報がレベルコントローラ8を介して伝達される。

【0037】また、上記した廃液槽10、一時保留槽9、新鮮培地槽5、培養ろ液槽6、及び洗浄液槽12にはそれぞれ除菌フィルタ15、15を介して大気側に連通している。この実施例において、器壁等に付着して成長してしまった大きな細胞塊を除去する手段として、培養槽41に超音波発振機26とその端子27組み込んでいる。端子27は上槽41a及び下槽41bに各1個設置されているが、2つ以上であってもよい。

【0038】この培養槽41においては、通気ノズル1

8より通気することにより、培養液の攪拌が行われる。通気により生じる泡沫は上槽41aに上部に配置した消泡ネット22により除去される。また、DO・pHセンサ23、温度センサ24はコントローラ25に接続しており、コントローラ25は灌流培養時に培養状態をモニタリングして温度、通気量を制御する。

【0039】本実施例においては、培養の途中で、通気攪拌を一時停止し、細胞塊を沈降させた後、適正細胞を含む上澄み培養液を一時保留槽9に吸引して一時保留し、培養槽41に残った細胞塊を廃液槽10に排出した後、前述の適正細胞を一時保留槽9から培養槽41に戻し、培養を継続することができる。若しくは、細胞塊を廃液槽10に出した後に、洗浄用の緩衝液を注入し、通気速度を強化し、強攪拌した後一時停止する操作を繰返して、器壁等に付着して成長してしまった大きな細胞塊を剥離し、その後、その細胞塊を含む洗浄液を排出し、一時保留していた細胞を培養槽41に戻し培養を継続することもできる。

【0040】若しくは、細胞塊を廃液槽10に出した後に、洗浄用の緩衝液を注入し、超音波発振機26及びその端子27により緩衝液に超音波を与え、器壁等に付着して成長してしまった大きな細胞塊を破壊、剥離し、その後、その細胞塊を含む緩衝液を排出し、一時保留していた細胞を培養槽41に戻し、培養を継続することができる。

【0041】以上の操作を培養の途中で間歇的に行うことによって、細胞塊を形成しやすい性状を持つ浮遊性細胞でも、形成された細胞塊が除去され、選択的に浮遊化した細胞を残し培養及び生産に良好な状態で培養を継続することが可能となる。

〔実施例5〕図5は本発明による培養装置を用いて医薬品製造を製造するシステムを概略的に示すフロー図である。図において、本発明による培養システム51より回収された培養液は分離、精製カラム52を経て有用物質が精製され、製剤システム53において、製剤された医薬品が製造される。

【0042】以上の説明は本発明の培養装置及び培養方法の幾つかの実施例についての説明であって、他に多く*

*の変形例が存在する。例えば、図1、2に示した実施例の場合であっても、浮遊する細胞塊を含む残りの培養液をすべて廃液槽に出した後に、洗浄用の緩衝液を注入し、かつ振動を与えることにより器壁等に付着して成長した大きな細胞塊を剥離し、その後、その細胞塊を含む洗浄液を排出し、一時保留していた細胞を培養槽1に戻し、培養を継続するようにしてもよく、また、そこに超音波発振器を付設してもよいものである。

【0043】

10 【発明の効果】本発明によれば、細胞同志あるいは器壁に対して付着し、細胞塊を形成しやすい性状を持つ細胞でも、浮遊してあるいは器壁等に付着して成長した大きな細胞塊を培養系外に除去し、細胞塊を形成していないばらばらの適正な細胞を選択して必要な量だけ、培養槽に残して培養を継続することができるので、細胞塊を形成しやすい性状を持つ細胞の連続灌流培養による物質生産が可能となる。

【図面の簡単な説明】

【図1】 本発明による培養装置の実施例1を概略的に示した説明図である。

【図2】 本発明による培養装置の実施例2を概略的に示した説明図である。

【図3】 本発明による培養装置の実施例3を概略的に示した説明図である。

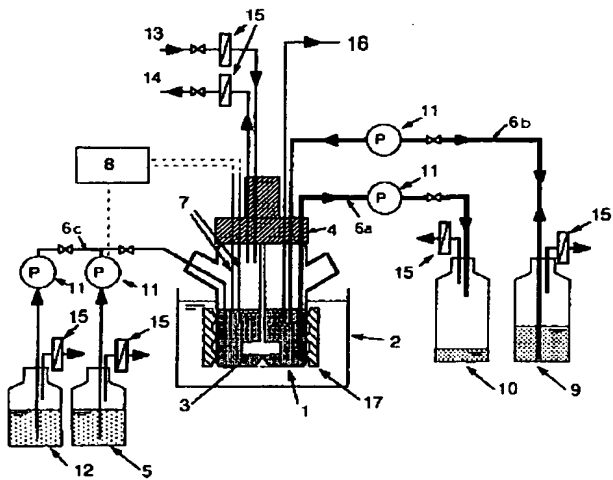
【図4】 本発明による培養装置の実施例4を概略的に示した説明図である。

【図5】 本発明による医薬品製造システムを概略的に示すフロー図である。

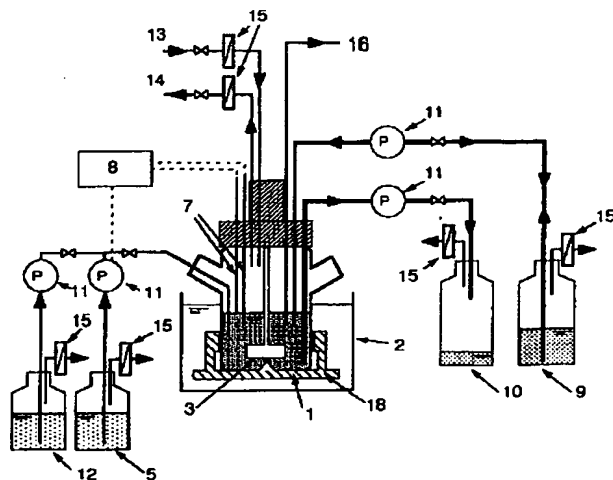
【符号の説明】

30 1…培養槽、2…恒温槽、3…攪拌子、5…新鮮培地槽、6…培養ろ液槽、7…レベルセンサ、8…レベルコントローラ、9…一時保留槽、10…廃液槽、11、…ポンプ、13…通気管、14…排気管、15…除菌フィルタ、17…パイププレート、17…振盪機、18…通気ノズル、23…DO・pHセンサ、24…温度センサ、25…コントローラ、26…超音波発振機、27…超音波発振端子、52…分離、精製カラム、53…製剤システム。

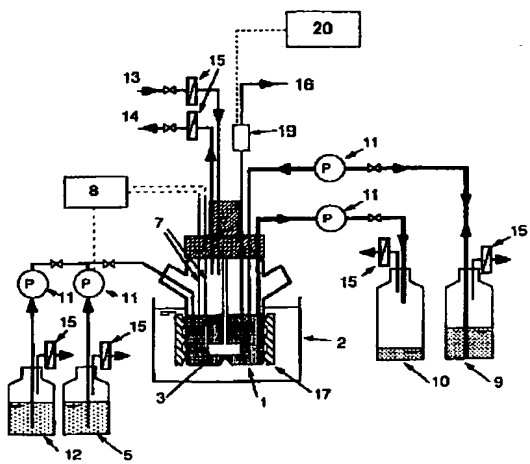
【図 1】



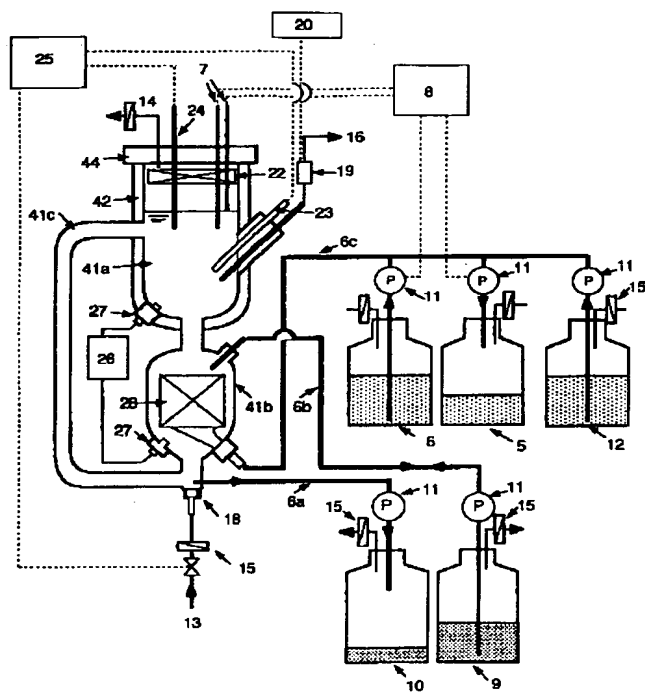
【図 2】



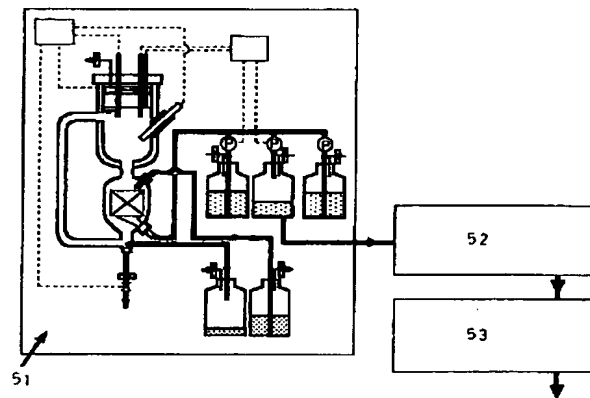
【図 3】



【図 4】



【図5】



フロントページの続き

(72)発明者 村上 聖

山口県下松市東豊井794番地 株式会社日
立製作所笠戸工場内